WELTORGANISATION FOR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Buro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ :	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:	WO 94/23035
C12N 15/29, C07K 13/00, A61K 39/36, G01N 33/53	A2 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Okto	ober 1994 (13.10.94)

(21) Internationales Aktenzeichen:

(22) Internationales Anmeldedatum:

31. März 1994 (31.03.94)

PCT/AT94/00039 (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

A 672/93

1. April 1993 (01.04.93)

ΑT

Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOMAY PRODUKTIONS UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DOLECEK, Christiane [AT/AT]: Anastasius Grüngasse 54/3/12, A-1180 Wien (AT). VRTALA, Susanne [AT/AT]; Pitkagasse 2/2/32, A-1210 Wien (AT). LAFFER, Sylvia [AT/AT]; Gymnasiumstrasse 85/318, A-1190 Wien (AT). STEINBERGER, Peter [AT/AT]; Jurekgasse 28/7, A-1150 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Petersbachgasse 128, A-2380 Perchtoldsdorf (AT). VALENTA, Rudolf [AT/AT]: Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT).
- (74) Anwälte: ITZE, Peter usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).

(54) Title: RECOMBINANT TIMOTHY GRASS POLLEN ALLERGEN Phl p II

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES LIESCHGRASPOLLENALLERGEN Phl p II

(57) Abstract

A recombinant DNA molecule codes for a peptide with the antigenicity of timothy grass pollen allergens Phi p Π . The amino acid sequence (5) and the most important B cell and T call epitopes of the molecule are derived therefrom. The recombinant Phl p II allergen is expressed in Escherichia coli and binds serum IgE of more than 60 % of all those allergic to grass pollen and may therefore be used in the same way as the naturally occurring Phi p II for processes based on antigenantibody interaction, mediator release and T cell reactivity.

(57) Zusammenfassung

Ein rekombinantes DNA Molekül, das für ein Peptid mit der Antigenität des Lieschgras Pollen Allergens Phl p II kodiert. Davon werden die Aminosäuresequenz und die wichtigsten B-Zell und T-Zell Epitope des Moleküls abgeleitet. Das rekombinante Phl p II Allergen wurde in Escherichia coli exprimiert und bindet Serum IgE von mehr als 60 % aller Graspollenallergiker und kann daher ebenso wie das natürlich vorkommende Phi p II für Verfahren Anwendung finden, die auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, Mediatorfreisetzung, und T-Zell Reaktivität beruhen.

Phl p II

ttg gat atc aac ccg tat cga tcc

ATG TOO ATG GOO TOO TOO TON AGO AGO AGO TTG CTG CCC ATG GOG 45 met ser ret ala ser ser ser ser ser leu leu ala met ala val len ala ala len phe ala siv ala tro cys val pro lys val

NCG THE NOG GTG GNG NAG GGG TOO NAC GNG NAG END CTG GGG GTG 135 thr phe thr wal glu lys gly ser ash glu lys his leu ala wal

CTG CTG AAG TAC GAG GGG GAC ACC ATG GOG CAG GTG GAG CTC CGG 180 leu val lys tyr glu gly asp thr met ala glu val phe leu arg

CAG CAC GGC TOO GAC GAG TOG GTC GGC ATG ACC AAG GGG GAG GGC 225 glu his gly ser asp glu trp val ala met thr lys gly glu gly

CCC GTG TCG ACC TTC CAC ACC GAG GAG CCG CTC CAG GGG CCC TTC 270 gly val trp thr phe asp ser glu glu pro leu gln gly pro she

AAC THE COS THE CHE ACE GAS AAS COS ANG AND AND GHC THE GAS 315 asn phe arg phe leu thr glu lys gly met lys asn val phe asp

CAC CTC CTC CCA CAG ACT ACA CCA TTG CCC CCC ACC TAC CCC CCA 360 asp val val pro glu ser thr pro leu gly ala thr tyr ala pro

GAA GAG TAG qlu qlu

cca tog gto cat cca cat gca tga tga tcc tto cat cca tot gat 45 tra gtt oga ttt too ttg tgt ttt gga aog aat tgt tgc aaa tta 90

cat gtt caa aga cat atg ttg cac gaa att tit tac taa aaa

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

	A	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AT	Osterreich			MW	Malawi
ΑÜ	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	-	
BB	Barbados	GE	Georgica	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungaro	NZ	Neusceland
BJ	Benin	Œ	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	π	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan .	RO	Ruminica
CA	Kaneda	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisiston	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ.	Kasachstan	SK	Slowakci
CM	Kamerun	LI	Liechteustein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Techod
cs	Tachechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
ÇZ.	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tedechikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dinemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MIL	Mali	UZ	Usbehistan
FR	Frankreich	MIN	Mongolei	VN	Victnam

1

Rekombinantes Lieschgraspollenallergen Phl p II

Gräserpollenallergien gehören zu den wichtigsten pflanzlichen Allergien während des Sommers. Mehr als 20% der Pollenallergiker zeigen allergische 5 Symptome auf Gräserpollen Allergene. Zu den wichtigsten Gräserpollenallergenen gehören Gruppe I (1), Gruppe V (2), Gruppe II/III (3) und Gruppe IV (4, 5) Allergene. Inzwischen wurde auch Profilin als Gräserpollen Allergen entdeckt (7, 8). Die erwähnten Allergene können als immunologisch und strukturell nahe verwandte Moleküle in Pollen unterschiedlicher Grasspezies gefunden werden und verwandte 10 Allergene einer Gruppe zeigen Kreuzreaktivität mit Patienten IgE. Bisher ist eine Reihe dieser Allergene mittels rekombinanter Techniken isoliert und in E. coli exprimiert worden (9). Viele von den in E. coli exprimierten Allergenen zeigen ähnliche Eigenschaften wie die natürlichen Proteine und können daher für Diagnose und Therapie von allergischen Erkrankungen verwendet werden (10, 11, 12). Es 15 wird nun erstmalig eine molekulare Charakterisierung einer vollständigen cDNA, die für Phl p II kodiert, sowie die Expression dieses Proteins in E. coli beschrieben. Ein vollständiges rekombinantes Gräserpollenallergen der Gruppe II/III war bisher nicht verfügbar und kann, wie aus den Beispielen ersichtlich ist, wie das natürliche Protein für Verfahren verwendet werden, die auf einer Antigen-Antikörperwechselwirkung 20 beruhen, wie für zelluläre Verfahren Anwendung finden, da sämtliche T-Zell Epitope am rekombinanten Molekül vorhanden sind wie am natürlichen Molekül. Weiters ist das rekombinante Phl p II für Verfahren geeignet, die meßbare Mediatorfreisetzung zur Folge haben. Die therapeutische Verwendung des rekombinanten Phl p II, basierend auf einer Einwirkung auf immunoregulatorische Reaktivität T-Zell und 25 Prozesse. Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, Mediatorfreisetzung folgt aus der strukturellen und biologischen Ähnlichkeit der natürlichen und rekombinanten Proteine. Die vorliegende Erfindung stellt eine vollständige cDNA, die für ein rekombinantes Phl p II Allergen kodiert, zur Verfügung. Anhand der von der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz werden 30 B-Zell und T-Zell Epitope des Phl p II Allergens bestimmt. Das rekombinante Phl p II Allergen wurde in E. coli hergestellt und besitzt ähnliche Eigenschaften wie natürliche Gräserpollenallergene der Gruppe II/III. Es folgt daraus, daß das rekombinante Phl p II Allergen so wie die natürlichen Allergene der Gruppe II/III für Verfahren verwendet werden kann, die auf einer 5 Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, einer antigenabhängigen T-Zellwirkung oder einer antigenabhängigen Mediatorfreisetzung beruhen, wobei aber die rekombinanten Allergene noch den Vorteil der höheren Reinheit und höheren Spezifität aufweisen.

Material und Methoden:

10

1. Konstruktion der cDNA Genbank

Lieschgraspollen (Allergon AB Engelholm, Schweden), der mit Hilfe von Licht- und Elektronenmikroskopie auf Reinheit untersucht worden war, wurde zur Isolierung von polyadenylierter RNA verwendet (13). cDNA Synthese wurde mit 15 oligo-dT und random Primern durchgeführt, die Enden der cDNA wurden mit T4-Polymerase glattverdaut und mit EcoRI-Linkern versehen. Die cDNA mit Linkern wurde in dephosphorylierte Lambda gtl1 Arme ligiert und verpackt. Es ergab sich eine cDNA Genbank von 800.000 unabhängigen Klonen (13).

20 2. Screening der cDNA Genbank, Subklonierung und DNA Sequenzanalyse

IgE Screening der Lieschgrasspollen cDNA Genbank wurde durchgeführt wie von Breiteneder et al., beschrieben (14). IgE bindende Klone wurden angereichert und aus diesen Klonen wurde Phagen-DNA präpariert (15). Mittels Kpn I und Sac I Schnitten konnten zwei DNA Fragmente erhalten werden, die beide Teile der 25 vollständigen Phl p II cDNA und flankierende lambda gtl1 Sequenzen enthielten. Die entstandenen KpnI/SacI und SacI DNA Fragmente wurden in das Plasmid pUC 18 subkloniert und E. coli XL-1 Blue damit tranformiert. Durch Restriktionsanalyse wurden geeignete Klone identifiziert und mittels lambda gtl1 forward sequencing primer (22-mer) und lambda gtl1 reverse sequencing primer (22-mer), Clontech 30 Laboratories, Palo Alto, USA sowie mittels M13 pUC18 forward and reversed

primern, Boehringer-Mannheim, Deutschland, nach Sanger (16) beidsträngig sequenziert.

3. RNA (Northern) Blots

10 μg von Gesamt-RNA aus Pollen von Lieschgras (Phleum pratense) und 5 denaturierenden Lolchgras (Lolium perenne) wurden mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet (17). Zur Isolierung der cDNA die für Phl p II kodiert wurde ausgehend von rekombinanten Phagen das entsprechende DNA Insert mittels PCR amplifiziert. Es wurden jeweils 5 picomol 10 primer (lambda gtl1 forward sequencing primer (22-mer) und lambda gtl1 reverse sequencing primer (22-mer), Clontech Laboratories, USA) eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und die Bande wurde mittels DEAE-Ionenaustauscherpapier eluiert (18). Die gewonnene DNA wurde mittels random priming ³²P-markiert (19). Prähybridisierung und Hybridisierung 15 wurden nach Standardmethoden durchgeführt (15). Die Blots wurden mit 3.0xSSC (20xSSC = 3M NaCl, 0.3M Na-Citrat, pH 7,0), 0.1%SDS (Natriumdodecylsulfat); 1.5 SSC, 0.1%SDS und anschließend mit 0.75% SSC, 0.1% SDS bei 50°C gewaschen und autoradiographiert (Hyperfilm MP, Amersham, London, UK).

20 <u>4. Expression der *Phl p* II cDNA in lysogenen</u> *E. coli* <u>Y1089 als β-</u> Galaktosidasefusionsprotein

Mit Hilfe von IgE Screening wurde ein vollständiger cDNA Klon erhalten, der für ein Phl p II Allergen kodiert. Mit rekombinanten Lambda gtll Phagen wurde der lysogene E. coli Stamm Y1089 infiziert und aus dem Ansatz wurde das 25 \(\beta\)-Galactosidase-Fusionsprotein gewonnen (20). Der Ansatz wurde in einem 7.5% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (21) und auf Nitrocellulose geblottet (22). Das Fusionsprotein wurde mit Hilfe von Serum-IgE von graspollenallergischen Patienten und einem jodmarkierten Kaninchen-anti-human IgE Antikörper (Pharmacia, Uppsala, Schweden) detektiert.

Die angeschlossenen Figuren dienen der Illustration der Verwendbarkeit des rekombinanten Phl p II Allergens für Verfahren, die auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, antigenabhängiger Mediatorfreisetzung, sowie antigenabhängiger zellulärer Reaktivität beruhen. Figur 1 zeigt die cDNA und die 5 davon abgeleitete Aminosäuresequenz des rekombinanten Phl p II Allergens. Es ist die vollständige cDNA Sequenz des Phl p II Allergens angeführt. Eine 24 Basen lange nichtkodierende Sequenz wurde am 5' Ende der cDNA vorgefunden, worauf eine 78 Basen lange Führungssequenz folgt, die für das in der Abbildung unterstrichene Signalpeptid kodiert (23). Die Aminosäuresequenz des reifen Proteins 10 kann ab Base 78 abgeleitet werden und beginnt mit Valin. Das Stopcodon TAG, welches die kodierende Sequenz am 3' Ende abbricht, ist mit einem Stem gekennzeichnet. Die 3 nicht kodierende Sequenz wird im poly A Schwanz beendet.

Figur 2 veranschaulicht die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz des rekombinanten *Phl p* II Allergens mit anderen Gruppe II/III Gräserpollenallergenen.

Figur 3 gibt die Beschreibung von B-Zell Epitopen des rekombinanten *Phl p* II Allergens wieder, und Figur 4 jene der T-Zell Epitope.

Figur 5 zeigt die Reaktivität des rekombinanten *Phl p* II Allergens mit Serum IgE von Graspollenallergikern. Rekombinantes *Phl p* II wurde als β-Galaktosidase Fusionsprotein in lysogenen *E. coli* Y1089 mittels Phageninfektion und Induktion 20 mit IPTG exprimiert. Die *E. coli* Proteine, welche das rekombinante *Phl p* II enthalten, wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. In Spur 1 wurde Serum IgE von einem Gruppe II/III reaktiven Patienten verwendet, in den Spuren 2 und 3 wurde mit IgE von Allergikern detektiert, die keine Reaktion mit Gruppe II/III Allergenen zeigen, und Spur 4 zeigt die Kontrolle mit Serum einer 25 nicht allergischen Kontrollperson.

Figur 6 gibt Tabelle wieder, die den Prozentsatz von eine graspollenallergischen Patienten mit IgE-Reaktivität gegen bestimmte Graspollenallergene auflistet. Es wird die Häufigkeit der Reaktivität von Graspollenallergikern mit verschiedenen Gräserpollenallergenen gezeigt. Die Werte 30 sind Richtwerte, die durch Testen mit natürlichen und rekombinanten Gräserpollenallergenen in einer repräsentativen Anzahl von Patier ten erhoben wurden.

Figur 7 belegt, daß rekombinantes *Phl p* II gleiche IgE-Epitope wie natürliche Gruppe II/III Allergene-IgE-Inhibition trägt. Das Serum eines Graspollenallergikers, 5 der mit Gruppe II/III Allergenen (10-12kD) und Gruppe I Allergenen (etwa bei 30 kD) IgE-Reaktivität zeigt, wurde mit rekombinantem *Phl p* II (Spur 2), rekombinantem *Phl p* I (Spur 3), rekombinantem *Bet v* I (Spur 4), oder *E. coli*-Proteinen (Spur 1) vorinkubiert. Vorinkubation mit rekombinanten *Phl p* II bringt die IgE-Bindung an natürliches *Phl p* II im 12 kD Bereich fast völlig zum 10 verschwinden, während die Reaktivität mit *Phl p* I bei 30 kD nicht beeinträchtigt wird. Rekombinantes *Phl p* I reduziert nur die Bindung an natürliches *Phl p* I, hat aber keine Wirkung auf die IgE-Bindung an *P h l p* II. Die Vorinkubation mit Kontrollproteinen, rekombinanten *Bet v I* und E. *coli* Proteinen beeinträchtigt die IgE-Bindung an natürliches *Phl p* II nicht. Daraus folgt, daß 15 rekombinantes *Phl p* II ähnliche oder gleiche IgE-Epitope wie natürliches *Phl p* II trägt, jedoch keine antigene Verwandtschaft mit natürlichen oder rekombinanten Allergenen der Gruppe I gegeben ist.

Figur 8 verdeutlicht die Hybridisierung der cDNA, die für Phl p II kodiert, mit mRNA aus Lieschgras und Lolchgras. Gesamt RNA wurde aus Lolchgras (Spurl) 20 und Lieschgras (Spur 2) Pollen isoliert, 10,µg im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die mit Phosphor 32 markierte cDNA, für kodierend für Phl p II, hybridisiert sowohl mit Lolchgras als auch Lieschgras RNA etwa in Höhe der 18S RNA aber auch deutlich darunter bei etwa 600 Basen Transkriptgröße. Die Kreuzhybridisierung zeigt die strukturelle Ähnlichkeit der 25 Transkripte welche für Gruppe II/III Allergene in verschiedenen Grasspezies kodieren.

Figur 9 A und B zeigt die Reaktivität des rekombinanten Phl p II Allergens mit einem Antikörper spezifisch für Gruppe II/III Gräserpollenallergene

A: Lambda gtl1 Phagen, die Lieschgraspollenallergene und das Hauptallergen 30 der Birke, Bet v I (Co), exprimieren sowie nicht rekombinante Phagen (λ) wurden

im Dot Blot Verfahren mit Antikörpern spezifisch für Graspollenallergene getestet. 4B 1 bindet an Gruppe V Allergene, R4 detektiert Gruppe I Allergene, und R5 identifiziert Gruppe V und Gruppe II/III Allergene. B: Die Graphik illustriert die Klonbezeichnung. Rekombinantes *Phl p* II wird von Klon A exprimiert.

5

Beispiele:

Sequenzanalyse des rekombinanten *Phl p* II Allergens-Ähnlichkeit mit anderen 10 Gruppe II/III Allergenen

Die DNA Sequenz des *Phl p* II Allergens wurde durch Sequenzierung der cDNA nach der Methode von Sanger (16) bestimmt. Abbildung 1 zeigt die bestimmte DNA-Sequenz und die daraus abgeleitetete Aminosäuresequenz. Ein dem reifen Protein voranstehendes Signalpeptid, das signifikante Homologie mit anderen 15 eukaryotischen Signalpeptiden zeigt, beweist eindeutig, daß Gruppe II/III Allergene von distinkten Genabschnitten kodiert werden und nicht durch proteolytischen Zerfall aus Gruppe I Allergenen entstehen. Die in Abbildung 2 gezeigte hohe Sequenzhomologie (ungefähr 70% Sequenidentität) des rekombinanten *Phl p* II mit den homologen Proteinen aus dem Lolchgras (Lol p II und Lol p III) zeigt die enge 20 strukturelle Verwandtschaft dieser Proteine und liefert damit die molekulare Basis für die immunologische Verwandtschaft von Gruppe II/III Allergenen verschiedener Spezies.

Bestimmung der B-Zell und T-Zell Epitope des rekombinanten Phl p II 25 Allergens

Anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *Phl p* II Allergens konnten die B-Zell und T-Zell Epitope unter Verwendung geeigneter Computerprogramme (24, 25) bestimmt werden. Die relevanten B-Zell und T-Zell Epitope sind in den Figuren 3 und 4 zusammengefaßt. Synthetische Peptide, die B-Zell Epitopen entsprechen, 30 binden IgE von Graspollenallergikern, während synthetische Peptide, die T-Zell

Epitopen entsprechen, T-Zellen von Graspollenallergikern zur Proliferation anregen und erhöhte H3-Thymidinaufnahme zur Folge haben.

Expression der cDNA kodierend für Phl p II in E. coli als rekombinantes 5 Phl p II Allergen

Rekombinante Phagen, die die cDNA für *Phl p* II enthalten. wurden zur Infektion mit lysogenem *E. coli* Y 1089 verwendet. Rekombinantes \(\beta\)-Galaktosidase Fusionsprotein wurde durch Induktion mit IPTG (Isopropyl-\beta\)-Thiogalaktosid) in Flüssigkultur gewonnen (20). Das Kontrollprotein \(\beta\)-Galaktosidase zeigte keine 10 IgE-Bindung am Western Blot w\(\beta\)hrend das rekombinante *Phl p* II Fusionsprotein spezifisch mit Serum IgE von Patienten, die mit Gruppe II/III Allergenen verschiedener Grasspezies reagierten, deutliche IgE-Bindung zeigte.

IgE-Bindungsfähigkeit des rekombinanten Phl p II Allergens

- 15 Serum eines Graspollenallergikers, der mit natürlichen Allergenen der Gruppe II/III reagiert, wurde mit rekombinanten *Phl p* II vorinkubiert und damit Gruppe II/III spezifisches IgE abgebunden. Figur 6 zeigt, daß die Bindung an natüliche Gruppe II/III Allergene fast vollständig durch die Vorinkubation ausgelöscht wird, während die Bindung an Gruppe I und Gruppe V Allergene nicht beeinflußt wurde.
- 20 Dies zeigt, daß die IgE-Epitope von natürlichen Gruppe II/III Allergenen durch rekombinantes *Phl p* II abgedeckt werden, und daß kaum relevante Kreuzreaktivität zwischen Gruppe I, Gruppe V und Gruppe II/III Allergenen bestehen.

Kreuzhybridisierung der Phl p II cDNA mit Lol p II/III mRNA

25 Gesamt RNA von Lolchgras und Lieschgraspollen wurde isoliert, im denaturienden Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Membran wurde mit einer vollständigen cDNA, die für *Phl p* II kodiert, hybridisiert. Hybridisierende Banden finden sich jeweils in Höhe der 18S ribosomalen RNA sowie deutlich darunter. Die Hybridisierung ist deutlich intensiver 30 mit Lieschgras RNA als mit Lolchgras, RNA obwohl nach der Gelfärbung mit

Ethidiumbromid etwa gleiche Mengen Gesamt RNA verwendet wurden. Dennoch konnte unter stringenten Bedingungen Kreuzhybridisierung erzielt werden. Das größere Transkript stellt unter Umständen eine größere und noch unreife RNA dar, da die Hybridisierung auch stringentem Waschen standhielt. Dieses Beispiel soll die 5 Homologie der Gruppe II/III Gräserpollenallergene verschiedener Spezies dokumentieren.

Literaturnachweis:

- 1.Freidhoff, L.R., Ehrlich-Kautzky, E., Grant, J.H., Meyers, D.A., and Marsh, D.G. (1986) J Allergy Clin Immunol 78, 1190-1201
- 5 2. Matthiesen, F., Lowenstein, H. Clin Exp Allergy 21, 309-320.
 - 3. Ansari, A.A., Shenbagamurthi, P., and Marsh, D.G. (1989) J. Biol. Chem. 264, 11181-11185
 - 4. Kisil, F. T., Jaggi, K. S., Lin, Z. W., Ekramodullah, A. K. M. (1989) in Sehon A. H., Kraft, D., Kunkel, G. eds. Epitopes of Atopic Allergens, 22-25.
- Jaggi, K. S., Ekramodullah, A. K. M., Kisil, F. T., Dzuba-Fischer, J. M.
 M., Rector, E. S., and Sehon, A. H. (1989) J Allergy Clin Immunol 83, 845-852.
 - 6. van Ree, R., Driessen, N. B. M., van Leeuwen, W. A., Stapel, S. O., and Aalberse, R. C. (1992) Clin Exp Allergy.
- 7. Valenta, R., Duchêne, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, 15 P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelmann, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1992) J Exp Med 175, 377-385.
 - 8. Valenta, R., Duchêne, M., Vrtala, S., Valent, P., Sillaber, C., Ferreira, F., Tejkl, M., Hirschwehr, R., Ebner, C., Kraft, D., and Scheiner, O. (1993) Int Arch Allergy Appl Immunol 99, 271-273.
- 9. Scheiner, O., Bohle, B., Breitenbach, M., Breiteneder, H., Duchêne, M., Ebner, C., Ferreira, F., Hirschwehr, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Pettenburger, K., Rumpold, H., Steiner, R., Tejkl, M., Valenta, R., and Kraft, D. (1992) in: Advances in Allergology and Clinical Immunology, Godard, P., Bousquet, J., and Michel, F. B. eds. The Parthenon Publishing Group.
- 25 10. Valenta, R., Duchêne, M., Vrtala, S., Birkner, T., Ebner, C., Hirschwehr, R., Breitenbach, M., Rumpold, H., Scheiner, O., and Kraft, D. (1991)
 J Allergy Clin Immunol 88, 889-894.
 - 11. Valenta, R., Vrtala, S., Ebner, C., Kraft, D., and Scheiner, O. (1992) Int Arch Allergy Appl Immunol 97, 287-294

10

- 12. Valenta, R., Sperr, W. R., Ferreira, F., Valent, P., Sillaber, C., Tejkl, M., Duchêne, M., Ebner, C., Lechner, K., Kraft, D., and Scheiner, O. (1993). J Allergy Clin Immunol 91, 88-97.
- 13. Vrtala, S., Sperr, W. R., Reimitzer, I., vanRee, R., Laffer, S., Müller, 5 W.-D., Valent, P., Lechner, K., Rumpold, H., Kraft, D., Scheiner, O., and Valenta, R. (1993) J Immunol (accepted provided revision).
 - 14. Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O., and Breitenbach, M. (1989) EMBO J 8, 1935-1938
- 15. Ausubel, F. M. (1990) in Current protocols in molecular biology, Wiley, 10 New York.
 - 16. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74, 5463-5468.
- 17. Valenta, R., Breiteneder, H., Pettenburger, K., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1991) J Allergy Clin Immunol 87, 15 677-682.
 - 18. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 - 19. Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983) Anal Biochem 132, 6-13.
- 20. Huynh, T. V., Young, R. A., Davis, R. W. (1985) in: cDNA cloning, 20 Oxford, IRL Press, vol I, 49-78.
 - 21. Laemmli U. K. (1970) Nature 227, 680-685.
 - 22. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76, 4350-4354.
 - 23. Gavel, Y., and Heijne, G. (1990) FEBS Lett 261, 455-458.
- 25 24. Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) J Mol Biol 157, 105-132.
 - 25. Margalit, H., Spouge, J. L., Cornette, J. L., Cease, K. B., Delisi, C., and Berzofsky, J. A. (1987) J Immunol 138, 2213-2229.

PATENTANSPRÜCHE:

- 1. Rekombinantes DNA Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenität des 5 Allergens Phl p II (Lieschgras Pollen Allergen), insbesondere monokotyledoner Gewächse, besitzt oder für ein Peptid, das mindestens ein Epitop dieses Allergens aufweist, sowie eine Nukleinsäuresequenz, die mit der genannten Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
- Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
 daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit der in Abb. 1 dargestellten gesamten Sequenz oder Teilbereichen derselben in homologer Weise übereinstimmt.
 - 3. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die durch Degeneration aus der in Abb. 1 dargestellten Sequenz ableitbar ist.
- 4. Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die für ein Polypeptid kodiert, das als Antigen kreuzreaktiv mit dem *Phl p* II Allergen, insbesondere monokotyledoner Gewächse, ist und zu diesem eine hohe Homologie aufweist.
- Rekombinantes DNA Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch
 gekennzeichnet, daß es funktionell mit einer Expressionskontrollsequenz zu einem Expressionskonstrukt verbunden ist.
 - 6. Wirtssystem, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einem rekombinanten Expressionskonstrukt nach Patentanspruch 5 transformiert ist.
- 7. Aus einem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 abgeleitetes 25 rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die Antigenität von Phl p II oder zumindest eines Epitops davon aufweist.
 - 8. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder ein Polypeptid nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit der in Abb. 1 gezeigten Sequenz im Ganzen oder in Teilen entspricht.

12

- 9. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Patentanspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fusionsprodukt darstellt, das die Antigenität des Phl p II Allergens des Lieschgrases oder zumindest eines Epitops davon aufweist und einen zusätzlichen Polypeptidanteil aufweist, wobei 5 das gesamte Fusionsprodukt von der DNA eines Expressionskonstrukts gemäß Anspruch 5 kodiert wird.
- 10. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Patentanspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der besagte zusätzliche Polypeptidanteil ß-Galactosidase oder ein anderes zur Fusion geeignetes Polypeptid 10 ist.
 - 11. Diagnostisches oder therapeutisches Reagens, dadurch gekennzeichnet, daß es ein synthetisches Protein oder Polypeptid gemäß einem der Patentansprüche 7 bis 10 enthält.
- 12. Verfahren, zum in vitro Nachweis der Allergie eines Patienten gegen das 15 Phl p II Allergen, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion der IgE Antikörper im Serum des Patienten mit einem rekombinanten oder synthetischen Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 7 bis 10 gemessen wird.
- 13. Verfahren, zum in vitro Nachweis der zellulären Reaktion auf das Phl p II Allergen, dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinantes oder synthetisches
 20 Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 7 bis 10 zur Stimulierung oder Hemmung der zellulären Reaktion eingesetzt wird.
 - 14. Verfahren zur Behandlung eines Säugetieres, das eine Pollenallergie aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß ihm ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 7 bis 10 verabreicht wird.

PUL	Р	T T	

	_														
ttg	gat	atc	aac	ccg	tat	cga	tcc								-24
ATG met	TCC ser	ATG met	GCG ala	TCC ser	TCC ser	TCA ser	AGC ser	AGC ser	AGC ser	TTG leu	CTG leu	GCC ala	ATG met	CCG ala	45
GTG val	CTG leu	GCG ala	GCG ala	CTG leu	TTT phe	GCC ala	ajv eec	GCG ala	TGG tro	TGC cys	GTC val	CCG pro	AAG lys	GIG val	90
ACG thr	TTC phe	ACG thr	GTG val	GAG glu	AAG lys	œ gly	TCC ser	AAC asn	GAG glu	AAG lys	CAC his	CTG leu	GCG ala	GTG val	135
CTG leu	GTG val	AAG lys	TAC tyr	GAG glu	gly GGG	GAC asp	ACC thr	ATG met	GCG ala	GAG glu	GTG val	GAG phe	CTC leu	CGG arg	180
GAG glu	CAC his	gjy GGC	TCC ser	GAC asp	GAG glu	TGG trp	GTC val	GCC ala	ATG met	ACC thr	AAG lys	gly gly	GAG glu	gly GGC	225
													CCC pro		270
													TTC phe		315
													GCG ala		360
	GAG glu														369
cca	tcg	gtc	cat	cca	cat	gca	tga	tga	tcc	ttc	cat	cca	tct	gat	45
tta	gtt	cga	ttt	tcc	ttg	tgt	ttt	gga	acg	aat	tgt	tgc	aaa	tta	90
cat	gtt	caa	aga	cat	atg	ttg	cac	gaa	att	ttt	tac	taa	aaa		132

40

--EGDTMAEVELREHGS

<u>MSMASSSSSLLAMAVLAALFAGAWÇ</u>VPKVTFTVEKGSNEKHLAVLVKY

III

Д

Lol

H

Lol p

HH

Phl p

H

Ω

Phl

rol p

AAPVEFTVEKGSDEKNIAI.SIKYNKEGDSMAEVELKEHGS

-TKVDLTVEKGSDAKTLVINIKYTRPGDTLAEVELRQHGS

NEWLALKKNGDGVWEIKSDKPLKGPFNFRFVSEKGMRNVFDDVVPADFKVGITY-PEK

DEWVAMTKGEGGVWTFDSEEPLQGPFNFRFLTEKGMKNVFDDVVPESTPLGATXAPEE

EEWEPMIKKG-NLWEVKSAKPLIGPMNFRFLSKGGMKNVFDEVIPTAFTVGKTYTPEYN

IOI P III

Fig. 2

II Phl p

Phl p II B-Zell Epitope:

Folgende B-Zell Epitope wurden bestimmt :

Epitop 1: VEKGSNEKH	(AS 8-16)
Epitop 2: KYEGDT	(AS 22-27)
Epitop 3: REHGSDE	(AS 34-40)
Epitop 4: TKGEGGV	(AS 45-51)
Epitop 5: FDSEEPLQGPF	(AS 54-64)
Epitop 6: LTEKGMKN	(AS 69-76)
Epitop 7: FDDVVPESTPLGATYA	(AS 78-93)

Fig. 3

Phl p II T-Zell Epitope:

Folgende T-Zell Epitope wurden bestimmt:

Epitop 1: TVEKGSNEKHL (AS 7-17)

Epitop 2 : KHLAVLVKYEG (AS 15-25)

Epitop 3 : LVKYEGDTMAE (AS 20-30)

Epitop 4 : KYEGDTMAEVF (AS 22-32)

Epitop 5 : GDTMAEVFLRE (AS 25-35)

Epitop 6: DTMAEVFLREH (AS 26-36)

Epitop 7: TMAEVFLREHG (AS 27-37)

Epitop 8 : MAEVFLREHGS (AS 28-38)

Epitop 9 : AEVFLREHGSD (AS 29-39)

Epitop 10: FLREHGSDEWV (AS 32-42)

Epitop 11: LREHGSDEWVA (AS 33-43)

Epitop 12: TFDSEEPLQGP (AS 53-63)

Epitop 13: DSEEPLQGPFN (AS 55-65)

Epitop 14: FRFLTEKGMKN (AS 66-76)

Epitop 15: RFLTEKGMKNV (AS 67-77)

Epitop 16: FLTEKGMKNVF (AS 68-78)

Epitop 17: LTEKGMKNVFD (AS 69-79)

Epitop 18: TEKGMKNVFDD (AS 70-80)

Epitop 19: EKGMKNVFDDV (AS 71-81)

Epitop 20: KGMKNVFDDVV (AS 72-82)

Epitop 21: GMKNVFDDVVP (AS 73-83)

Fig. 4

Epitop 22: MKNVFDDVVPE (AS 74-84)

Epitop 23: KNVFDDVVPES (AS 75-85)

Epitop 24: NVFDDVVPEST (AS 76-86)

Epitop 25: VFDDVVPESTP (AS77-87)

Fig. 4 Fortsetzung

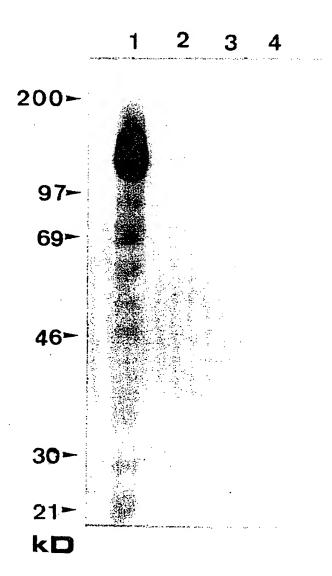


Fig. 5

Allergen	Prozentsatz der reaktiven Graspollenallergiker
Gruppe I	>90%
Gruppe II/III	60%
Gruppe IV	50%
Gruppe V	>80%
Profilin	20%

Fig. 6

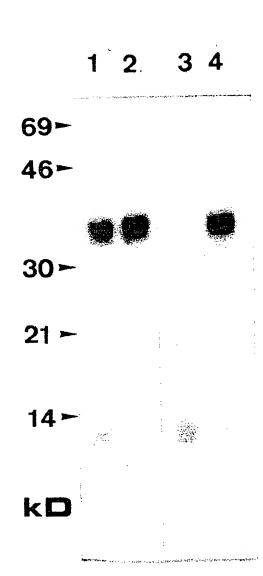


Fig. 7

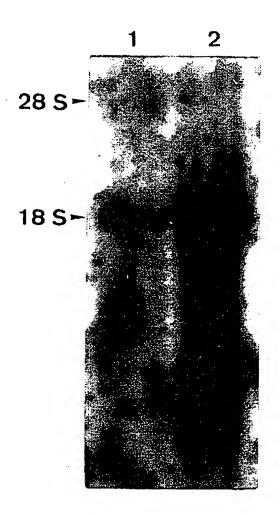
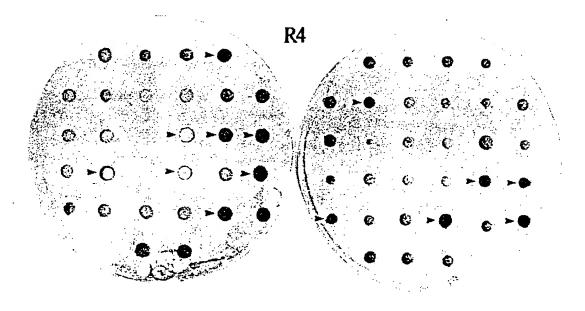


Fig. 8

10/12



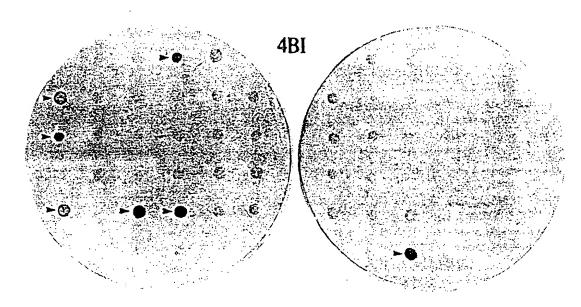


Fig. 9A

ERSATZBLATT (REGEL 26)

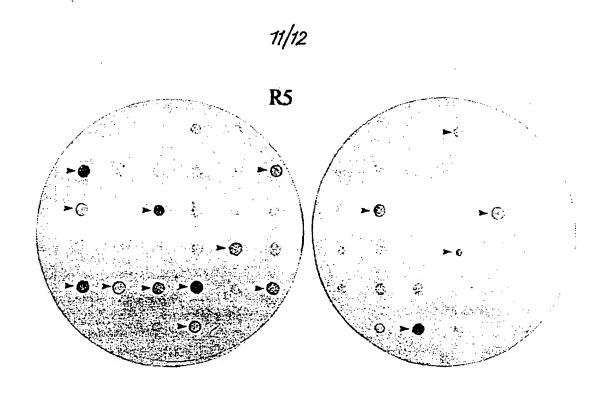


Fig. 9A

•		-	12/12	•				9B
					\		·	Fig. 9B
		140	164	196	238		\	
	123	144 140	170 164	200	265			
	133	153	171	207	300 270	316		
1	139 134	158	171 176 171	218		Co 322 316		
	139	162		222	303	ပိ		
		163	192	235	305			
					_			
		13	31	Phly II 43	82			
	H	14	33		90	9	1	
	œ	15	35	59	95	2 116	1	
1	0	18	36	61	66	122	1	
\	10	H	(')					
	11 1(20 1	40	55 (108	~		

PCT WELTORGANISATION FOR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Biliro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5:

C12N 15/29, C07K 13/00, A61K 39/36, G01N 33/53

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 94/23035

A3

Veröffentlichungsdatum:

13. Oktober 1994 (13.10.94)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/AT94/00039

(22) Internationales Anneldedatum:

31. März 1994 (31.03.94)

(30) Prioritätsdaten:

A 672/93

1. April 1993 (01.04.93)

AT

(71) Annelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DOLECEK, Christiane [AT/AT]; Anastasius Grüngasse 54/3/12, A-1180 Wien (AT). VRTALA, Susanne [AT/AT]; Pitkagasse 2/2/32, A-1210 Wien (AT). LAFFER, Sylvia [AT/AT]; Gymnasiumstrasse 85/318, A-1190 Wien (AT). STEINBERGER, Peter [AT/AT]; Jurekgasse 28/7, A-1150 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Petersbachgasse 128, A-2380 Perchtoldsdorf (AT). VALENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT).
- (74) Anwälte: ITZE, Peter usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FL, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

(43) Internationales

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Anderungen einweffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen-24. November 1994 (24.11.94) berichts:

(54) Title: RECOMBINANT TIMOTHY GRASS POLLEN ALLERGEN Phi p II

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES LIESCHGRASPOLLENALLERGEN Phl p II

(57) Abstract

A recombinant DNA molecule codes for a peptide with the antigenicity of timothy grass pollen allergens $\dot{P}h\dot{l}~p$ II. The amino acid sequence (5) and the most important B cell and T cell epitopes of the molecule are derived therefrom. The recombinant Phl p II allergen is expressed in Escherichia coli and binds serum IgE of more than 60 % of all those allergic to grass pollen and may therefore be used in the same way as the naturally occurring Phi p II for processes based on antigenantibody interaction, mediator release and T cell reactivity.

(57) Zusammenfassung

Ein rekombinantes DNA Molekül, das für ein Peptid mit der Antigenität des Lieschgras Pollen Allergens Phl p Il kodiert. Davon werden die Aminosäuresequenz und die wichtigsten B-Zell und T-Zell Epitope des Moleküls abgeleitet. Das rekombinante Phl p II Allergen wurde in Escherichia coli exprimiert und bindet Serum IgE von mehr als 60 % aller Graspollenallergiker und kann daher ebenso wie das natürlich vorkommende Phl p II für Verfahren Anwendung finden, die auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, Mediatorfreisetzung, und T-Zell Reaktivität beruhen.

Phl p II

ttg gat atc aac ccg tat cga tcc

-24

ATG TOO ATG GCG TOO TOO TOA AGO AGO AGO TTG CTG GCC ATG GCG 45 met ser met ala ser ser ser ser ser ser len len ala met ale

CITE CIG COS COS CITE TITT COS COSC COSS TOSC TOSC CITE COSS AMAG CITE 90 val leu ala ala leu phe ala gly ala tro cys val pro lys val

NOG TITO ACC GITG GAG AAG GGG TOO AAC GAG AAG CAC CITG GCG GTG 135 thr phe thr val glu lys gly ser asn glu lys his leu ala val

CTG GTG AAG TAC GAG GGG GAC ACC ATG GGG GAG GTG GAG CTC CCC 180 leu val lys tyr glu gly asp thr met ala glu val phe leu arg

CAG CAC COC TOC CAC CAG TOG GTC GCC ATG ACC AAG CCG CAG CCC 225 glu his gly ser asp glu trp val ala met thr lys gly glu gly

OCC GTG TOG ACG TITC GAC ACC GAG GAG COG CTC CAG GGG CCC TTC 270 gly val trp the phe asp ser glu glu pro leu gln gly pro phe

AND THE COS THE CHE ACC GAS AND GOD ATG AND AND GIT THE GAD 315 ash phe arg phe leu thr glu lys gly mot lys ash val phe asp

CAC GTC GTC CCA CAG AGT ACA CCA TTG GGG GGC AGC TAC GGG GCA 360 asp val val pro glu ser the pro leu gly ala the tyr ala pro

CAA GAG TAG glu glu

cca tog gcc cat cca cat gca tga tga tcc ttc cat cca tct gat 45

tta gtt oga ttt too ttg tgt ttt gga acg aat tgt tgc aaa tta 90

cat gtt caa aga cat atg ttg cac gaa att ttt tac taa aaa

PCT WELTORGANISATION FOR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Biltro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5:

C12N 15/29, C07K 13/00, A61K 39/36, G01N 33/53

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 94/23035

A3

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

13. Oktober 1994 (13.10.94)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/AT94/00039

AT

(22) Internationales Anmeldedatum:

31. März 1994 (31.03.94)

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

A 672/93

1. April 1993 (01.04.93)

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenberichs. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Anderungen eintreffen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).

(72) Erfinder; and

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DOLECEK, Christiane [AT/AT]; Anastasius Grüngasse 54/3/12, A-1180 Wien (AT). VRTALA, Susanne [AT/AT]; Pitkagasse 2/2/32, A-1210 Wien (AT). LAFFER, Sylvia [AT/AT]; Gymnasiumstrasse 85/318, A-1190 Wien (AT). STEINBERGER, Peter [AT/AT]; Jurekgasse 28/7, A-1150 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Petersbachgasse 128, A-2380 Perchtoldsdorf (AT). VALENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT).
- (74) Anwälte: ITZE, Peter usw.: Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen-24. November 1994 (24.11.94)

(54) Title: RECOMBINANT TIMOTHY GRASS POLLEN ALLERGEN Phl p II

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES LIESCHGRASPOLLENALLERGEN Phl p II

(57) Abstract

A recombinant DNA molecule codes for a peptide with the antigenicity of timothy grass pollen allergens $Ph\hat{l} p \parallel$. The amino acid sequence (5) and the most important B cell and T cell epitopes of the molecule are derived therefrom. The recombinant PhI p II allergen is expressed in Escherichia coli and binds serum IgE of more than 60 % of all those allergic to grass pollen and may therefore be used in the same way as the naturally occurring Phi p II for processes based on antigenantibody interaction, mediator release and T cell reactivity.

(57) Zusammenfassung

Ein rekombinantes DNA Molekül, das für ein Peptid mit der Antigenität des Lieschgras Pollen Allergens Phl p Il kodiert. Davon werden die Aminosäuresequenz und die wichtigsten B-Zell und T-Zell Epitope des Moleküls abgeleitet. Das rekombinante Phl p II Allergen wurde in Escherichia coli exprimiert und bindet Serum IgE von mehr als 60 % aller Graspollenallergiker und kann daher ebenso wie das natürlich vorkommende Phi p II für Verfahren Anwendung finden, die auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, Mediatorfreisetzung, und T-Zell Reaktivität beruhen.

Phi p II

ttg gat atc aac ccg tat cga tcc

-24

ATC TOO ATG GOG TOO TOO TOA ACC ACC TOG THE CTG COO ATG GOG 45 met ser mer ala ser ser ser ser ser ser leu leu ala ret ala

OTTO CTIC COOR COOR CTIC TITT COOR COOR COOR TOOK TOOK CTIC COOR AAAC CTIC 90 val leu ala ala leu phe ala gly ala trp cys val pro lys val

NCG THE ACG GTG CAG AAG GGG TOE AAC GAG AAG CAC CTG GCG GTG 135 thr phe thr val glu lys gly ser asn glu lys his leu ala val

CTG GTG ANG TAC GAG GGG GAC ACC ATG GGG GAG GTG GAG CTC GGG 180 leu val lys tyr glu gly asp thr met ala glu val phe leu arg

GAG CAC GGC TYCC GAC GAG TYGG GTTC GGC ATTG ACC ANG GGG GAG GGC 225 glu his gly ser asp glu trp val ala met thr lys gly glu gly

CCC GTG TOG ACG TTC GAC ACC GAG GAG GCG CTC CAG GCG CCC TTC 270 gly val trp thr phe asp ser glu glu pro leu gln gly pro phe

AAC TIC CCC TIC CTC ACC CAG AAC CCC ATG AAC AAC GTC TIC CAC 315 asn phe arg phe leu thr glu lys gly met lys asn val phe asp

GAC GTC GTC CCA GAG AGT ACA CCA TTG GGG GGC AGC TAC GGG GCA 360 asp val val pro glu ser thr pro leu gly ala thr tyr ala pro

GAA GAG TAG glu glu

cca tog gto cat cca cat gca tga tga tcc tto cat cca tot gat 45

tta git oga tit too tig tgt tit gga acg eat tgt tgc aea tta 90

cat git caa aga cat atg itg cac gaa att tit tac taa aaa

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

ATU BB BBF BG BJR BY CCF CG CC	Österreich Australien Barbados Belgien Burkina Faso Bulgarien Benin Brasilien Belarus Kanada Zentrale Afrikanische Republik Kongo Schweiz Côte d'Ivoire Kamerun China Tschechoslowakei Tschechische Republik Deutschland Dänemark Spanien Finnland Frankreich	GA GB GE GN GR HU IE IT JP KG KP KZ LI LU MD MD MM MN	Gabon Vereinigtes Königreich Georgien Guinea Griechenland Ungarn Irland Italien Japan Kenya Kirgisistan Demokratische Volksrepublik Korea Republik Korea Republik Korea Kasachstan Liechtenstein Sri Lanka Luxemburg Lettland Monaco Republik Moldau Madagaskar Mali Mongolci	MRW MWE NL NO NZ PL PT RO SE SI SK STD TG TJ TUA UZ VN	Mauretanien Malawi Niger Niederlande Norwegen Neusceland Polen Portugal Rumänien Russische Föderation Sudan Schweden Slowakenien Slowakei Senegal Tschad Togo Tadschikistan Trinidad und Tobago Ukraine Vereinigte Staaten von Amerika Usbekistan Vietnam
---	---	--	---	--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internation	Application No
PCT/AT	94/00039

A. CLASS IPC 5	IFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/29 C07K13/00 A61K39/3	6 G01N33/53	
According (to International Patent Classification (IPC) or to both national classif	fication and IPC	
	SEARCHED		
IPC 5	locumentation searched (classification system followed by classification C12N C07K A61K	on symbols)	
	non searched other than minimum documentation to the extent that s	·	earched
Electronic d	lata base consulted during the international search (name of data bas	c and, where practical, search terms used)	
C. DOCUM	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the re-	devant passages	Relevant to claim No.
X	INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY IMMUNOLOGY, vol.97, 1992, BASEL, CH pages 287 - 294 R.VALENTA ET AL. 'Diagnosis of Gr Pollen Allergy with Recombinant T Grass (PhTeum pratense) Pollen Alcited in the application see page 288, left column, paragr	rass imothy lergens'	1-11
X Fur	ther documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed	in annex.
"A" docum consist "E" earlier filling "L" docum which citatii "O" docum other	alegories of cited documents: nent defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance of comment but published on or after the international date nent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another on or other special reason (as specified) ment referring to an oral disclosure, use, exhibition or means ment published prior to the international filing date but than the priority date claimed	"T" later document published after the int or priority date and not in conflict we cited to understand the principle or invention "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the description of particular relevance; the cannot be considered to involve an inventive step when the decument is combined with one or a ments, such combination being obvining the art. "&" document member of the same pales.	the the application our theory underlying the claimed invention at the considered to counted it is taken alone a claimed invention inventive step when the more other such docu-
	c actual completion of the international search	Date of mailing of the international	
	30 September 1994	07.10.94	
Name and	mailing Litress of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Face (+31-70) 340-3016	Authorized officer Cupido, M	

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/AT 94/00039

CACCONTINUATION) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant parages Relevant to claim No. P, X FEBS LETTERS., vol.335, no.3, 13 December 1993, AMSTERDAM NL pages 299 - 304 C.DOLECEK ET AL. 'Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen' see page 303, right column, paragraph 1
P,X FEBS LETTERS., vol.335, no.3, 13 December 1993, AMSTERDAM NL pages 299 - 304 C.DOLECEK ET AL. 'Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen'
vol.335, no.3, 13 December 1993, AMSTERDAM NL pages 299 - 304 C.DOLECEK ET AL. 'Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen'

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AT 94/00039

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)
This inte	ernational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1. X	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
	Remark: Although Claim 14 is related to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.
2.	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
1.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remar	the additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
ł	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internati :s Aktenzeichen
PCT/AT 94/00039

A. KLASS IPK 5	iFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C12N15/29 C07K13/00 A61K39/36	G01N33/53	
Nach der In	sternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klass	ifikation und der IPK	
B. RECHE	RCHIERTE GEBIETE		
IPK 5	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole C12N C07K A61K		
	te aber nicht zum Mindessprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sowe		
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Nam	e der Datenbank und evd. verwendete	Suchbegriffe)
C. ALS W	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe o	ler in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY IMMUNOLOGY, Bd.97, 1992, BASEL, CH Seiten 287 - 294 R.VALENTA ET AL. 'Diagnosis of Gra Pollen Allergy with Recombinant Ti Grass (Phleum pratense) Pollen All in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 288, linke Spalte, Abs	ss mothy ergens'	1-11
X W	citere Veröffendichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu	Siehe Anhang Patentfamilie	
Besonde 'A' Verd 'E' altern 'L' Verd sche sand soli aus; 'O' Ver cin 'P' Verd	ifferntichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als bezonders bedeutsam anzusehen ist es Dohument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen neldedatum veröffentlicht worden ist ffentlichung, die gezignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- sinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer eren im Recherehenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie geführt) öffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,	I' Spätere Veröffentlichung, die nach de oder dem Prioritändatum weröffent Anmeldung nicht kollidiert, sondern Erfindung zugrundeliegenden Prinzt Theorie angegeben ist. Veröffentlichung von benonderer Bekam allein aufgrund dieser Veröffentlichung von benonderer Bekam nicht als auf erfinderischer Tärgkeit berubend bev Veröffentlichung von besonderer Bekam nicht als auf erfinderischer Tärwerden, wenn die Veröffentlichungs Veröffentlichungen dieser Kategori dieser Vertindung für einen Fachnura. Veröffentlichung, die Mitglied ders Absendedatum des internationalen	a nur zum Verständnis des der ps oder der ihr zugrundeliegenden deutung die beanspruchte Erfindun, nüchung nicht als neu oder auf strachtet werden detuning die beanspruchte Erfindun ligkeit beruhend betrachtet mit einer oder mehreren anderen ein Verbindung gebracht wird und ann naheliegend ut eiben Patentfamilie ist
Name u	nd Postanochrist der Internationale Recherchenbehårde Europäisches Patentami, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk	Bevollmächtigter Bediemsteter	
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Cupido, M	

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internati s Aktenzenchen
PCT/AT 94/00039

C.(Fortsetzu	ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	Betr. Anspruch Nr.
Categorie"	Bezeichnung der Veröffentlichung, sowat erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	oer. Amproca Nr.
, x	FEBS LETTERS., Bd.335, Nr.3, 13. Dezember 1993, AMSTERDAM NL Seiten 299 - 304 C.DOLECEK ET AL. 'Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen' siehe Seite 303, rechte Spalte, Absatz 1	1-13
		·

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. Jonales Aktenzeichen

PCT/AT94/00039

Feld I	Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)
Cemail	Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Grunden für bestimmte Anspruche kein Recherchenbericht erstellt:
1. X	Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behorde nicht verpflichtet ist, nämlich Obwohl Anspruch 14 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/ tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung.
2.	Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
з. 🗌	Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhangige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz. 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II	Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)
Die inter	nationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält
1.	Da der Anmelder alle erforderlichen zusatzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2.	Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtferügt hätte, hat die Internationale Recherchenbehorde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.	Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Anspruche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Anspruche Nr.
4.	Der Anmelder hat die erforderlichen zusatzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenberteht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaße
Bemerku	ngen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusatzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusatzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.